

REZUMAT

CERCETĂRI PRIVIND UTILIZAREA ULEIURILOR ESENȚIALE ÎN HRĂNIREA SUPPLEMENTARĂ A FAMILIILOR DE ALBINE

Doctorand: LAZĂR Roxana Nicoleta

Conducător științific: Prof.dr.ing. PĂTRUICĂ Silvia

CUVINTE CHEIE: albine, hrănire suplimentară, uleiuri esențiale.

Cercetările realizate în cadrul tezei de doctorat intitulată „Cercetări privind utilizarea uleiurilor esențiale în hrănirea suplimentară a familiilor de albine” a avut ca scop evaluarea influenței uleiurilor esențiale asupra indicilor bioproductivi, stării de sănătate și însușirilor chimice ale mierii.

Pentru realizarea scopului urmărit au fost abordate următoarele direcții de cercetare:

- Cuantificarea substanțelor biologice active din componența uleiurilor esențiale;
- Evaluarea influenței uleiurilor esențiale asupra prolificității mătcii și dezvoltării familiilor de albine;
- Evidențierea influenței uleiurilor esențiale asupra stării de sănătate a familiilor de albine;
- Argumentarea utilizării uleiurilor esențiale din punct de vedere al creșterii producției de miere și eficienței economice;
- Caracterizarea organoleptică, chimică și biotehnologică a mierii obținute în urma utilizării uleiurilor esențiale.

Teza de doctorat intitulată „Cercetări privind utilizarea uleiurilor esențiale în hrănirea suplimentară a familiilor de albine” este structurată în două părți principale. Prima parte cuprinde 3 capitole în care se prezintă stadiul actual al cunoașterii în conformitate cu obiectivele propuse, tratând astfel aspecte legate de specificul nutriției familiilor de albine cu accent pe cunoașterea structurii microbiotei intestinale, digestia albinelor și cerințele nutriționale ale acestora, hrănirea suplimentară a familiilor de albine și utilizarea fitoaditivilor la albine. Partea a doua cuprinde 5 capitole și este prezentată contribuția personală, materialele și metodele de lucru utilizate, rezultatele obținute, discuții, concluzii în ceea ce privește compoziția chimică a uleiurilor esențiale luate în studiu (cimbru, ienupăr, rozmarin, busuioc, oregano, cuișoare, mentă, scorțișoară), efectul uleiurilor esențiale asupra indicilor bioproductivi a familiilor de albine, asupra stării de sănătate a acestora, studiu histomorfometric privind dezvoltarea vilozităților intestinale, caracterizarea organoleptică și chimică a mierii, activitatea antioxidantă și antimicrobiană a acesteia. În această teză sunt inserate 21 de tabele, 55 de figuri și 36 grafice. Bibliografia cuprinde 201 titluri bibliografice.

Capitolul 1 este sistematizat în două subcapitole. În subcapitolul 1 este prezentat specificul nutriției familiilor de albine în care am abordat morfofiziologia aparatului digestiv la albine și digestia acestora, tratând subiecte care implică metabolismul glucidelor, protidelor, lipidelor și sărurilor minerale, respectiv cerințele și modul de asigurare a substanțelor nutritive la albine prezentând pe scurt sursele de energie, proteine, vitamine și minerale, apă.

Capitolul 2 cuprinde subcapitolul care abordează subiectul hrănirii suplimentare a familiilor de albine în care sunt prezentate tipurile de hrăniri: hrănirea de stimulare energetică, proteică, energo-proteică, hrănică de completare și hrănirea medicamentoasă.

Capitolul 3 face referire la utilizarea fitoaditivilor la albine și cuprinde două subcapitole. În primul subcapitol se prezintă tema utilizării fitoaditivilor sub formă de ceaiuri, extracte și tincturi la albine, iar în subcapitolul 2 sunt abordate beneficiile utilizării uleiurilor esențiale asupra familiilor de albine.

Materialul biologic utilizat în cadrul experimentelor a fost reprezentat de 90 de familii de albine apaținătoare speciei *Apis mellifera*, localitatea Murani, Stupina Cernat, județul Timiș și 18 familii de albine din Stupina Facultății de Bioingineria Resurselor Animaliere din cadrul Universității de Științele Vieții „Regele Mihai I” din Timișoara.

Cercetările au fost efectuate în laboratorul de chimie la Platforma de Cercetare Interdisciplinară „Agricultură ecologică și siguranța alimentelor”, în laboratorul de Anatomie și histologie la Facultatea de Bioingineria Resurselor Animaliere, în laboratorul de Anatomie și histologie patologică și laboratorul de microbiologie la Facultatea de Medicină Veterinară din cadrul Universității de Științele Vieții „Regele Mihai I” din Timișoara.

Capitolul 4 abordează evaluarea compoziției chimice a unor uleiuri esențiale. În urma efectuării analizei chimice a celor 8 uleiuri esențiale luate în studiu s-a observat că valorile componentelor prezente variază între 0,026% (+)-4-Carene și 85,17% Eugenol. S-a constatat că uleiurile esențiale studiate au o compoziție chimică foarte diferită, predominând în cazul uleiului esențial de cimbru Borneol (17,5%); în cazul uleiului esențial de busuioc Estragole (55,73%); în uleiul esențial de rozmarin predomină Eucalyptol (52,82%); în cazul uleiului esențial de ienupăr compusul Alpha pinene (49,75%); în componența uleiului esențial de oregano a predominat Karvacrol (33,42%); uleiul esențial de mentă a avut un conținut ridicat de Menthone (30,73%); uleiul esențial de cuișoare a avut un conținut mare de Eugenol (85,17%), iar în componența uleiului esențial de scorțișoară a predominat compusul Cinnamaldehyde (69,28%).

Prezența în concentrații diferite a compușilor chimici identificați în uleiurile esențiale analizate pot fi responsabili de efectul diferit asupra unor potențiali agenți patogeni cauzatori de boli ai familiilor de albine. Totodată, unii compuși chimici din uleiurile esențiale pot avea o influență favorabilă sau inhibitorie asupra depunerii ponteii mătci corelată cu dezvoltarea familiilor de albine și exprimarea potențialului productiv.

În **capitolul 5** sunt prezentate cercetările privind evaluarea utilizării uleiurilor esențiale asupra îmbunătățirii indicilor bioproductivi a familiilor de albine. S-a observat că la 10 zile de la administrarea siropului de zahăr în care s-au adăugat uleiuri esențiale o creștere a numărului de celule cu puieți între 11,88% (cimbru) și 39,86% (busuioc) comparativ cu lotul martor. Creșterea numărului de celule cu puieți a fost constatată și în cazul administrării uleiurilor esențiale de mentă (20,27%), oregano (21,67%), rozmarin (17,24%) și ienupăr (24,70%). Rezultate semnificative statistic s-au obținut în cazul lotului cu conținut de ulei esențial de busuioc ($p < 0,01$).

La 21 zile de administrare a hranei suplimentare cu adaos de uleiuri esențiale s-a înregistrat o creștere a numărului de celule cu puieți între 12,22% (scorțișoară) și 50% (cimbru și busuioc) ($p < 0,001$). Loturile experimentale hrănite cu sirop de zahăr în care s-a încorporat ulei esențial de cimbru și ulei esențial de busuioc au înregistrat o creștere a numărului de celule cu puieți de 50% ($p < 0,001$) comparativ cu lotul martor. Lotul experimental cu adaos de ulei esențial de oregano a avut o creștere a numărului de celule cu puieți cu 40,97% ($p < 0,01$), urmat de lotul cu adaos de ulei esențial de mentă (29,86%) ($p < 0,01$) comparativ cu lotul martor. Uleiul esențial de ienupăr a determinat creșterea cantității de puieți cu 27,03% ($p < 0,05$), iar în cazul uleiului esențial de rozmarin s-a evidențiat o creștere a numărului de celule cu puieți de 18,47% ($p < 0,05$) comparativ cu lotul martor. În cazul celorlalte uleiuri esențiale utilizate, s-a înregistrat o creștere a numărului de celule cu puieți cu 12,22% la lotul cu adaos de ulei esențial de scorțișoară, iar la lotul cu adaos de ulei esențial de cuișoare cantitatea de puieți a crescut cu 16,80% comparativ cu lotul martor la diferențe nesemnificative statistic.

Hrănirea familiilor de albine primăvara cu sirop de zahăr în care s-a încorporat câte un ulei esențial (cimbru, ienupăr, rozmarin, busuioc, oregano, cuișoare, mentă, scorțișoară) a avut ca efect stimularea ponteii mătci corelate cu dezvoltarea familiilor de albine și o producție mai mare de miere. Dezvoltarea familiilor de albine după hrănirea cu sirop de zahăr și uleiuri esențiale a fost observată și din creșterea numărului de rame ocupate cu albine.

În ceea ce privește producția de miere, familiile de albine aparținând loturilor hrănite cu sirop de zahăr și uleiuri esențiale au înregistrat creșteri ale producției de miere cuprinse între 7,53% (ulei de scorțișoară) și 31,09% (ulei de mentă).

Utilizarea uleiului esențial de busuioc a determinat dezvoltarea coloniilor de albine și creșterea semnificativă a producției de miere la culesul de rapiță ($p < 0,001$). Corelații puternic pozitive au fost înregistrate între numărul de celule cu puieți și producția de miere și în cazul uleiului esențial de cimbru ($R^2 = 0,859$, $p < 0,001$), mentă ($R^2 = 0,718$, $p < 0,001$) și oregano ($R^2 = 0,621$, $p < 0,001$). Corelații slab pozitive între numărul de celule cu puieți și producția de miere

au fost observate la lotul cu adaos de ulei esențial de scorțișoară ($R^2=0.482$, $p>0.05$) și în cazul utilizării uleiului esențial de rozmarin, cuișoare, ienupăr ($p>0.05$).

Costul hrănirii suplimentare pe parcursul celor 3 săptămâni a unei colonii de albine din lotul martor a fost de 1.29 euro. În cazul loturilor cărora li s-a administrat în siropul de zahăr câte un ulei esențial costul cu hrănirea suplimentară a fost între 1.44 – 1.50 euro. Costul loturile la care s-a adăugat ulei esențial de cimbru, oregano, ienupăr și scorțișoară a fost de 1.44 euro/familia de albine. În cazul uleiurilor de rozmarin, mentă, cuișoare costul a fost de 1.47 euro/familia de albine, iar costul la lotul cu adaos de busuioc a fost de 1.50 euro/familia de albine.

Producția obținută în urma administrării hrănirii suplimentare cu sirop de zahăr în care s-au adăugat câte unul din uleiurile esențiale studiate, după culesul de rapiță a fost între 26,49 – 32,16 kg/familia de albine, iar producția de miere a lotului martor a fost de 25,09 kg/familia de albine.

Veniturile realizate din vânzarea mierii de rapiță au fost mai mari în cazul hrănirii suplimentare a familiilor de albine cu adaos de uleiuri esențiale comparativ cu lotul martor hrănit doar cu sirop de zahăr. Acestea au fost între 97,48 – 121,44 euro/familia de albine comparativ cu lotul martor de la care am obținut un venit de 92,09 euro/familia de albine.

În Capitolul 6 sunt evidențiate efectele utilizării uleiurilor esențiale asupra stării de sănătate a familiilor de albine. Din frotiurile efectuate și examinate, precum și din însămânțările pe medii de cultură speciale s-a constatat că bacteriile însămânțate, provenite din intestinul albinelor luate în studiu aparțin genurilor: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* iar dintre ciupercile microscopice s-a identificat *Candida* (prima recoltare) și *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* (a doua recoltare) și *Bacillus*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* (recoltarea cu numărul trei).

În perioada de primăvară, la începutul experimentului numărul total de germeni de la nivelul intestinului albinelor lucrătoare a fost apropiat la toate variantele experimentale. După prima și a doua administrare de hrană suplimentară în care s-au adăugat uleiuri esențiale s-a observat reducerea numărului total de germeni la lotul hrănit cu sirop de zahăr în care s-a încorporat uleiul esențial de cimbru (16,53%), ulei esențial de cuișoare (16,31%), oregano (12,58%) și rozmarin (7,34%). La 21 de zile de la administrarea uleiurilor esențiale s-au observat diferențe majore privind numărul total de germeni din intestinul albinelor lucrătoare comparativ cu lotul martor. La finalizarea experimentului s-a observat reducerea numărului total de germeni la nivel intestinal la toate loturile experimentale comparativ cu lotul martor. Valorile procentuale au fost cuprinse între 14,22% (busuioc) și 36,36% (scorțișoară). După 3 săptămâni de administrare a uleiurilor esențiale, lotul cu adaos de rozmarin a avut ca efect reducerea cu 21,50 % a numărului total de germeni comparativ cu lotul martor, uleiul de ienupăr a redus numărul total de germeni cu 24,14%, fiind urmat de uleiul esențial de oregano cu 27,82%.

Administrarea uleiurilor esențiale de cimbru, ienupăr, rozmarin, busuioc, oregano, cuișoare, mentă, scorțișoară în hrănirea de completare a familiilor de albine toamna, a determinat reducerea numărului total de germeni de la nivelul intestinului albinelor cu 32,54% în cazul uleiului esențial de oregano, 29,95% în cazul uleiului esențial de mentă, iar uleiul esențial de cimbru a redus numărul total de germeni la nivel intestinal cu 25,43%.

Reducerea numărului total de germeni de la nivelul intestinului albinelor lucrătoare este corelată cu o stare de sănătate mai bună a familiilor de albine.

În Capitolul 7 sunt prezentate cercetările privind evaluarea histologică a intestinului subțire în urma utilizării uleiurilor esențiale. Din analiza histomorfometrică realizată la nivelul mucoasei intestinale a rezultat faptul că administrarea uleiurilor esențiale în hrana suplimentară a familiilor de albine a influențat dezvoltarea vilozităților intestinale în funcție de uleiul administrat. Astfel, înălțimea medie a vilozităților intestinale la loturile experimentale a variat între 66,32 μm (ienupăr) și 141,2 μm (mentă), comparativ cu lotul martor la care înălțimea medie a fost de 51,68 μm .

Se evidențiază în cazul lotului la care s-a adăugat ulei esențial de mentă, o dezvoltare a vilozităților intestinului subțire cu 173,21% mai mare comparativ cu lotul martor. Următorul lot experimental la care s-au observat diferențe semnificative statistic ($p<0,01$) în ceea ce privește dezvoltarea vilozităților a fost cel cu adaos de ulei esențial de scorțișoară la care s-a observat o creștere cu 86,84%. La lotul cu adaos de ulei esențial de oregano s-a observat o evoluție în ceea ce privesc vilozitățile intestinale, acestea înregistrând valori cu 57,27% mai mari comparativ cu lotul martor. Uleiul esențial de busuioc a evidențiat o evoluție a dezvoltării vilozităților intestinale cu 43,18%, uleiul esențial

de cimbru cu 36,76%, uleiul esențial de rozmarin cu 35,06%, uleiul esențial de cuișoare cu 29,95%, iar uleiul esențial de ienupăr cu 28,32%, valorile înregistrate fiind semnificativ statistic ($p < 0,01$) comparativ cu lotul martor.

Capitolul 8 abordează caracterizarea organoleptică și chimică a mierii rezultate în urma utilizării uleiurilor esențiale și potențialul biotehnologic al acestora exprimat prin activitatea antioxidantă și antimicrobiană.

Rezultatele obținute la prima recoltare arată faptul că probele de miere au avut un număr de puncte foarte apropiat între loturi ceea ce ne indică faptul că, calitatea mierii a fost apropiată din punct de vedere al caracteristicilor senzoriale la toate variantele experimentale, aceasta provenind din rezerva de iernare a familiilor de albine.

În urma analizării probelor de miere recoltate după culesul de rapiță s-a constatat o îmbunătățire a însușirilor organoleptice ale mierii comparativ cu recoltarea II, cuprinsă între 9 și 25 puncte. Cel mai bun punctaj a fost obținut de LE1 (cimbru), LE7 (mentă) și LE5 (oregano), acesta fiind de 9 puncte, ceea ce denotă o calitate mai bună comparativ cu lotul martor. În cazul LE3 (rozmarin) și LE4 (busuioc) s-a constatat, conform punctajului (13 puncte) o îmbunătățire a calității comparativ cu lotul martor. După analiza LE2 (ienupăr), LE6 (cuișoare) și LE8 (scorțișoară) s-au constatat efecte slab pozitive în ceea ce privește calitatea mierii (21 puncte) comparativ cu lotul martor (25 puncte). După examinarea "mierii" (recoltarea II) s-au evidențiat efecte pozitive în ceea ce privesc însușirile organoleptice la toate loturile experimentale cu punctaje cuprinse între 5 puncte (cimbru) și 24 puncte (lotul martor). Astfel că, LE1 (cimbru), LE7 (mentă), LE5 (oregano) au obținut punctaje mai mari însemnând îmbunătățirea însușirilor organoleptice.

Analiza probelor de miere la începutul experimentului (miere polifloră din rezerva de iarnă) a relevat procentul de umiditate între 14,94% și 21,93%. La 7 zile de la administrarea siropului de zahăr cu uleiuri esențiale, s-a observat o scădere a conținutului de apă a probelor la toate variantele experimentale, în timp ce la lotul martor, conținutul de apă a crescut cu 2,2%. La trei săptămâni de la utilizarea uleiurilor esențiale în hrănirea suplimentară a familiilor de albine, respectiv după prima recoltare (recoltarea de rapiță), loturile experimentale au înregistrat creșteri ale conținutului de apă din miere între 0,66% (cimbru) și 2,94% (scorțișoară).

Conținutul de impurități a variat între 4,11% la loturile la care s-a utilizat ulei esențial de oregano, după recoltarea III și 9,11% pentru proba de miere cu ulei esențial de mentă, după recoltarea I. În urma analizării probelor recoltate după administrarea siropului de zahăr cu uleiuri esențiale, respectiv după recoltarea mierii de rapiță, o reducere a conținutului de impurități existente în miere a fost observată la toate loturile experimentale, în special la loturile la care s-a folosit ulei esențial de oregano, mentă și busuioc, comparativ cu lotul martor.

Valorile analizate pentru conținutul de cenușă au fost cuprinse între 0,23% și 0,46%. În cazul LE7 (ulei esențial de mentă) s-a observat o reducere cu 23,33% a conținutului de cenușă între recoltarea I și recoltarea III. Uleiul esențial de cuișoare a înregistrat după a treia recoltare o reducere a conținutului de cenușă cu 14,70% față de prima recoltare. Valoarea medie a probelor supuse calcinării în ceea ce privește prima recoltare a fost de 0,31%, a doua recoltare de 0,31%, iar a treia recoltare, de 0,30%, obținându-se astfel o reducere a cantității de cenușă cu 3,22% între prima și ultima recoltare. Reducerea conținutului de cenușă a probelor cu adaos de ulei esențial de mentă se poate corela cu rezultatele obținute în urma determinării umidității care arată faptul că la lotul hrănit cu sirop de zahăr și adaos de ulei esențial de mentă, mierea recoltată a avut un procent mai mare de umiditate raportat la procentul de substanță uscată. Conținutul de substanțe minerale din miere poate fi influențat de compoziția uleiurilor esențiale datorită compușilor activi prezenți.

Evaluarea acidității probelor de miere obținute la recoltarea I și recoltarea II nu au evidențiat modificări semnificative comparativ cu lotul martor. La recoltarea III probele provenite de la loturile hrănite cu adaos de uleiuri esențiale au înregistrat modificări ale profilului de aciditate comparativ cu lotul martor. Lotul la care a fost folosit uleiul esențial de oregano a avut aciditatea mierii cu 26,82% mai mică, iar în cazul utilizării uleiului esențial de cimbru s-a observat o reducere a acidității cu 25%. Uleiul esențial de ienupăr a redus aciditatea cu 28,12% fiind urmat de lotul cu adaos de ulei esențial menta (29,41%) și uleiul esențial de cuișoare (35,48%). Lotul martor nu a prezentat la cele 3 recoltări modificări semnificative ale acidității mierii. Diferențe semnificative statistic s-au înregistrat între toate loturile hrănite cu sirop de zahăr și ulei esențial din recoltarea III și martor și, de asemenea, între probele de cimbru (recoltarea I și II) și martor. Reducerea acidității probelor recoltării III (după culesul de rapiță) ne poate furniza informații asupra faptului că mierea provenită din nectarul florilor are un procent de aciditate mai mare comparativ cu

mierea rezultată în urma hrănirii suplimentare cu sirop de zahăr și uleiuri esențiale datorită conținutului de acizi din nectarul florilor la care se adaugă produși rezultați din prelucrarea enzimatică a acestuia de către albine.

Analiza pH-ului probelor de miere a fost efectuată la temperaturi cuprinse între 23,6 °C și 25,8 °C, valorile înregistrate fiind între 3,42 și 4,03. Atât datele înregistrate la probele recoltate înainte de administrarea siropului de zahăr cu adaos de uleiuri esențiale cât și probele recoltate după utilizarea uleiurilor esențiale, respectiv după recoltarea de rapiță, au avut valori apropiate ale pH-ului. Diferențe statistice au fost evidențiate la probele rezultate de la familiile de albine hrănite cu adaos de ulei esențial de mentă (recoltarea II), ienupăr, cuișoare, scorțișoară, oregano (recoltarea III).

Valorile conținutului de zahăr reducător au fost reduse la toate loturile experimentale la care au fost utilizate uleiuri esențiale, comparativ cu mierea din recoltarea I (înainte de administrarea uleiurilor esențiale). Valorile de reducere a zahărului reducător pentru loturile cu adaos de ulei esențial au fost cuprinse între 8,67% (ulei esențial de mentă) și 16,84% (ulei esențial de oregano). S-au observat diferențe statistice în cazul probei cu adaos de ulei esențial de cimbru comparativ cu lotul martor și în cazul uleiului esențial de scorțișoară comparativ cu lotul martor, la toate perioadele de recoltare. Diferențe semnificative s-au înregistrat și în cazul uleiului esențial de busuioc, mentă, oregano (Recolta III) comparativ cu lotul martor, urmate de loturile cu adaos de ulei esențial de oregano, cuișoare, ienupăr (Recolta II) și rozmarin (Recolta I) comparativ cu lotul de control.

La începutul experimentului, analizarea probelor de miere polifloră, care au rămas ca rezervă în timpul iernii în stup, s-a constatat că, conținutul total de fenoli în proba martor a fost de 122,02 (mgGAE)/100 g. Conținutul total de compuși fenolici la recoltarea I a fost între 110,12–159,74 (mgGAE)/100 g, cea mai mică valoare a fost înregistrată la loturile la care a fost introdus ulei esențial scorțișoară, iar cea mai mare valoare s-a înregistrat la loturile cu adaos de ulei esențial de busuioc. După 3 săptămâni de administrare a siropului de zahăr cu uleiuri esențiale, probele de miere recoltate au avut un conținut de polifenoli cuprins între 123,51–162,94 (mgGAE)/100 g. Proba martor a înregistrat cea mai mică valoare, respectiv proba de miere cu ulei esențial de busuioc cea mai mare valoare a conținutului total de fenoli, urmată de mentă și cimbru. Probele de miere de rapiță au avut un conținut total de fenoli între 123,91 (martor)—163,95 (mgGAE)/100 g. Cea mai mare valoare conținutului total de fenoli a fost înregistrată în urma analizării probei cu adaos de ulei esențial de busuioc, urmată de proba cu rozmarin, oregano, ienupăr, mentă, cimbru și scorțișoară. Valorile maxime au fost înregistrate în recoltarea II, cu excepția loturilor la care s-a introdus ulei esențial de rozmarin și ulei esențial de oregano unde, la recoltarea III, s-a obținut un conținut total de fenoli maxim. Cu excepția mierii recoltate după ultima administrare cu ulei de cimbru, pentru toate celelalte probe, există diferențe semnificative statistice în ceea ce privește conținutul total de fenoli față de lotul martor.

Rezultatele probelor luate în studiu evidențiază o creștere a conținutului de fenoli conferită de adăugarea în hrana familiilor de albine a uleiurilor esențiale. Conținutul total de fenoli la mierea recoltată de la familiile de albine în hrana cărora s-a adăugat ulei esențial de mentă a fost de 143,7 mgGAE/100g, iar în cazul probelor recoltate de la loturile cu adaos de ulei esențial de cimbru a fost de 137,88 mgGAE/100g. În cazul administrării în hrana suplimentară a familiilor de albine a uleiului esențial de busuioc s-a constatat o creștere a conținutului total de fenoli comparativ cu lotul de control, chiar și după 7 zile de la administrare, valori care rămân constante și după o luna de administrare a uleiurilor esențiale. În urma acestor rezultate se poate spune că uleiurile esențiale utilizate în hrana suplimentară a familiilor de albine pot îmbunătăți activitatea antioxidantă a mierii.

Conținutul de flavonoide variază între 8,41 mgQE/100 g la martor și 44,36 mg/100 g la lotul la care s-a utilizat ulei esențial de mentă. Conținutul de flavonoide a crescut după administrarea de sirop de zahăr cu uleiuri esențiale la toate probele luate în studiu după 7 zile; cea mai mare valoare fiind înregistrată la lotul cu adaos de ulei esențial de mentă și ienupăr. La loturile la care s-a folosit ulei esențial de mentă, oregano, rozmarin și ienupăr, conținutul de flavonoide a fost redus la recoltarea III comparativ cu recoltarea I, valorile fiind cuprinse între 8,41–19,51 mgQE/100 g. Probele cu conținut de ulei esențial de cimbru, busuioc, cuișoare și scorțișoară, au evidențiat o creștere a conținutului de flavonoide la recoltarea III comparativ cu prima recoltare, valorile fiind cuprinse între 27,05–30,60 mg QE/100 g. În cazul celei de a II-a recoltări, probele cu adaos de ulei esențial de cimbru, ienupăr și mentă au avut efecte pozitive, dar ne semnificative statistic comparativ cu proba martor (fără adaos de ulei esențial).

Rezultatele noastre arată o creștere a conținutului de flavonoide după 7 zile de la administrarea hranei suplimentare în care s-au încorporat uleiuri esențiale la toate variantele experimentale, ceea ce demonstrează

eficacitatea suplimentării hranei (sirop de zahăr îmbogățit cu uleiuri esențiale). După recoltarea II și III, există variații în conținutul de flavonoide, fie crește, fie scade în funcție de tipul de ulei esențial administrat. De remarcat că în lotul martor, cantitatea de flavonoide crește de la prima până la ultima recoltare, ceea ce înseamnă că aportul acestora este asigurat nu doar de siropul cu adaos de uleiuri esențiale introdus în hrănirea albinelor.

Activitatea antioxidantă (AA) a probelor de miere luate în studiu a fost evidențiată la toate loturile la care am administrat sirop de zahăr cu adaos de ulei esențial. Probele de miere cu adaos de ulei esențial de ienupăr, cuișoare, rozmarin, busuioc, cimbru, scorțișoară, oregano au înregistrat valori semnificative. Valoarea medie a activității antioxidante a mierii analizate a fost de 22,88% (recoltarea I), 30,15% (recoltarea II) și 50,37% după recoltarea III (pentru mierea de rapiță). În proba martor, valoarea activității antioxidante variază între 24,37% (recoltarea I) și 34,58% (recoltarea III), în timp ce la probele experimentale, după utilizarea uleiurilor esențiale, valorile acestea cresc până la 61,64%, valoarea maximă înregistrată pentru lotul la care a fost introdus ulei de ienupăr. Valori apropiate după recoltarea III au fost obținute atunci când uleiurile esențiale de busuioc, cuișoare sau rozmarin au fost utilizate în hrănirea albinelor. Probele din recoltarea II și recoltarea III au determinat creșteri semnificative statistic a activității antioxidante comparativ cu lotul martor. Cea mai mare valoare a activității antioxidante a fost înregistrată în experimentul nostru, după administrarea de ulei esențial de ienupăr (61,64%), urmat de uleiul esențial de cuișoare (57,93%), uleiul esențial de busuioc (56,33%) comparativ cu valoarea înregistrată la probele martor (34,58%) după recolta III. Creșterea activității antioxidante la sfârșitul experimentului este vizibilă pentru toate variantele experimentale, inclusiv martorul, dar într-o măsură mai mică comparativ cu activitatea antioxidantă înregistrată la probele îmbogățite cu uleiuri esențiale.

Activitatea antimicrobiană a probelor analizate este evidentă în cazul celor cu adaos de ulei esențial, dezvoltând în timp un efect inhibitor. Proprietățile inhibitoare sunt mult mai evidente în cazul recoltării III.

În cazul bacteriei *S. pyogenes*, activitatea antimicrobiană este foarte slabă în probele prelevate în recoltarea II. În schimb, creșterea concentrației probelor prelevate în recoltarea II a dus la un efect de potențare evident, cu valori mult mai mari decât cele ale lotului martor. Există un singur test cu efect inhibitor evident susținut cu creșterea concentrației, și anume în cazul probelor care au conținut ulei esențial de rozmarin (concentrația 37,5%, respectiv 50%). Valorile concentrației minime inhibitorii obținute variază între 0,747–0,719, cu valori mai mici decât cele obținute în cazul bacteriei *S. pyogenes* (0,796). Singurele probe cu efect inhibitor care cresc odată cu creșterea concentrației sunt probele aferente lotului martor (cu valori cuprinse între 0,734 și 0,748) precum și probele cu adaos de ulei esențial de oregano (concentrația 12,5%) (0,787), ulei esențial de cuișoare (concentrația 12,5%) (0,78) și ulei esențial de mentă (concentrația 12,5%) (0,704). Toate celelalte valori sunt mai mari decât valoarea de control, astfel, nu pot fi considerate concentrații minime inhibitorii și au un efect evident de potențare. Situația este puțin diferită în cazul recoltării III, când pe lângă menținerea efectului inhibitor al probelor cu adaos de ulei esențial de rozmarin, apare același efect și în cazul uleiului esențial de mentă cu concentrația de 25% (0,729), 37,5% (0,716) și 50% (0,705) ca și în cazul probelor îmbogățite cu ulei esențial de busuioc.

În cazul *S. aureus* (ATCC 25923), evoluția inhibiției între recoltarea II și recoltarea III este evidentă. Astfel, dacă în cazul recoltării II doar uleiul esențial de rozmarin, oregano și ienupăr au avut în mod evident activitate antistafilococică, susținută de creșterea concentrației, în cazul recoltării III, numărul de probe cu efect inhibitor este în număr mai mare și anume uleiul esențial de busuioc, cimbru, rozmarin, oregano și ienupăr. Chiar și valorile obținute în cazul probelor cu efect în ambele perioade de prelevare au avut efect antimicrobian îmbunătățit în recoltarea III. Acest lucru este evident în cazul probelor cu adaos de rozmarin, care în cazul recoltării II, valorile de inhibiție sunt prezente doar la două dintre concentrațiile testate rozmarin 37,5% și rozmarin 50% (0,67; 0,534), în timp ce în cazul recoltării III, toate concentrațiile testate au avut efect inhibitor, cu valori cuprinse între 0,564 și 0,621 comparativ cu lotul de control care a avut o densitate optică de 0,629 *S. aureus*.

Culturile bacteriene *S. flexneri*, *S. typhimurium* și *E. coli* s-au dovedit a fi unele dintre tulpinile cele mai susceptibile la activitatea probelor prelevate în timpul recoltării I. Deci, referitor la cultura bacteriană *S. flexneri*, cele mai eficiente probe cu valori de concentrație minimă inhibitorie s-au dovedit a fi lotul de control (0,923–0,878), lotul cu adaos de ulei esențial de busuioc (0,922–0,882), rozmarin (0,849–0,705), cuișoare (0,789–0,646) și scorțișoară (0,753). –0,714), comparativ cu controlul pozitiv (BHI) care a prezentat o densitate optică de 0,956.

În ceea ce privește efectul antibacterian al *P. aeruginosa* s-a observat că a fost tulpina cel mai puțin sensibilă. Dintre toate probele testate în timpul recoltării II, activitatea antibacteriană cu efect dovedit a fost prezentă numai la probele cu adaos de rozmarin 37,5% și rozmarin 50% și toate cele patru concentrații testate ale probelor cu adaos de ulei esențial de mentă (recoltarea III) (0,927–0,998).

În cercetarea noastră, *E. coli* s-a dovedit a fi cea mai sensibilă tulpină, fiind cea mai susceptibilă la majoritatea probelor testate în recoltarea II și, de asemenea, în recoltarea III. Doar probele îmbogățite cu ulei esențial de rozmarin, ienupăr și cuișoare, au dovedit valori ale concentrației minime inhibitorii dar cu efect de potențare, în timp ce toate celelalte probe testate au dovedit valori ale concentrației minime inhibitorii cu efect inhibitor evident, corelate cu concentrația.

În cazul culturii bacteriene *S. typhimurium*, în recoltarea II, efectul antibacterian a fost prezent doar la câteva probe, același efect fiind recunoscut și în recoltarea III, astfel: uleiul esențial de busuioc, cimbru, oregano și mentă pentru recoltarea II și lotul de control, busuioc, rozmarin și oregano în cazul recoltării III. Efectul a fost mai bun la recoltarea III, date susținute de valori care au dovedit un efect inhibitor în toate concentrațiile testate. Diferența a fost prezentă numai în cazul probei cu adaos de ulei esențial de mentă, în care efectul inhibitor în recoltarea II a scăzut în recoltarea III.

În cercetarea noastră, *H. influenzae* tipul B (ATCC 100211) a fost mai rezistent la efectul antibacterian al probelor testate în recoltarea II, fiind susceptibil doar la uleiul esențial de cuișoare (0,764–0,538), lotul de control 37,5% și 50% (1,233–1,103) și uleiul esențial de mentă pentru toate cele patru concentrații testate (1,127–1,273). În probele testate în timpul recoltării III, valorile concentrației minime inhibitorii dovedite de lotul de control, cimbru, rozmarin, oregano, cuișoare, scorțișoară și mentă au avut efect inhibitor, dovedite în toate concentrațiile testate.

În ceea ce privește efectul antifungic *C. parapsilosis* s-a dovedit a fi mai susceptibil, în timp ce *C. albicans* a arătat o sensibilitate mai mică la toate probele testate. În cazul bacteriei *C. parapsilosis*, pentru recoltarea II, uleiul esențial de cimbru, oregano, cuișoare și mentă 50%, au demonstrat valori ale concentrației minime inhibitorii corelate cu creșterea concentrației. Lotul de control, uleiul esențial de cimbru, rozmarin, oregano, cuișoare și mentă și-au menținut aceeași eficacitate în recoltarea III, cu valori ale densității optice mai mici în comparație cu cele obținute pentru recoltarea II, așa cum este prezentat. *C. albicans*, pe de altă parte, s-a dovedit a fi rezistent, prezentând valori ale concentrației minime inhibitorii care scad odată cu creșterea concentrației pentru toate probele testate, atât în recoltarea II, cât și în recoltarea III.

Prin aceste valori putem concluziona că uleiurile esențiale prezente în hrănirea suplimentară a albinelor au influențat producerea de miere cu efect antibacterian acesta crescând după două săptămâni de la administrare.

A B S T R A C T

RESEARCH ON THE USE OF ESSENTIAL OILS IN SUPPLEMENTARY FEEDING OF BEE COLONIES

PhD student: LAZĂR Roxana Nicoleta

Scientific coordinator: *Prof. PĂTRUICĂ Silvia, PhD*

KEY WORDS: bees, supplementary feeding, essential oils

The research carried out in the framework of the doctoral thesis entitled "Research on the use of essential oils in supplementary feeding of bee colonies" aimed to evaluate the influence of essential oils on the bioproductive indices, health status and chemical properties of honey.

To achieve the aim, the following research directions were approached:

- Quantification of the biologically active substances in essential oils;
- Evaluation of the influence of essential oils on queen fertility and bee colony development;
- Highlighting the influence of essential oils on the health status of bee colonies;
- Arguing the use of essential oils from the point of view of increasing honey production and economic efficiency;
- Organoleptic, chemical and biotechnological characterization of honey obtained successive to the use of essential oils.

The PhD thesis entitled "Research on the use of essential oils in supplementary feeding of bee colonies" is structured in two main parts. The first part includes 3 chapters in which the current state of knowledge is presented in accordance with the proposed objectives, thus dealing with aspects related to the specifics of the nutrition of bee colonies with an emphasis on knowing the structure of the intestinal microbiota, the digestion of bees and their nutritional requirements, the additional feeding of bee colonies and the use of phytoadditives in bees. The second part includes 5 chapters and presents the personal contribution, the materials and work methods used, the results obtained, discussions, conclusions regarding the chemical composition of the essential oils studied (thyme, juniper, rosemary, basil, oregano, clove, mint, cinnamon), the effect of essential oils on the bioproductive indices of bee colonies, on their health status, histomorphometric study on the development of intestinal villi, the organoleptic and chemical characterization of honey, its antioxidant and antimicrobial activity. 21 tables, 55 figures and 36 graphics are inserted in this thesis. The bibliography includes 201 bibliographic titles.

Chapter 1 is systematized in two subchapters. In subchapter 1, the specifics of the nutrition of bee colonies are presented in which we addressed the morphophysiology of the digestive system in bees and their digestion, dealing with topics involving the metabolism of carbohydrates, proteins, lipids and mineral salts, respectively the requirements and the way to provide nutrients to bees, presenting on briefly energy sources, proteins, vitamins and minerals, water.

Chapter 2 includes the sub-chapter that addresses the subject of supplementary feeding of bee colonies in which the types of feeding are presented: energy stimulation feeding, protein feeding, energy-protein feeding, complementary feeding and medicated feeding.

Chapter 3 refers to the use of phytoadditives in bees and comprises two sub-chapters. The first sub-chapter presents the topic of the use of phytoadditives in the form of teas, extracts and tinctures for bees, and in the 2nd sub-chapter the benefits of the use of essential oils on bee colonies are addressed.

The biological material used in the experiments was represented by 90 bee colonies belonging to the species *Apis mellifera*, village Murani, Apiary Cernat, Timiș County and 18 bee colonies from the Apiary of the Faculty of Bioengineering of Animal Resources, University of Life Sciences "King Mihai I" from Timișoara.

The research was carried out in the chemistry laboratory at the Interdisciplinary Research Platform "Ecological agriculture and food safety", in the Anatomy and histology laboratory at the Faculty of Bioengineering of Animal Resources, in the Pathological anatomy and histology laboratory and the Microbiology laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine, at University of Life Sciences "King Mihai I" from Timișoara.

Chapter 4 addresses the evaluation of the chemical composition of some essential oils. Following the chemical analysis of the 8 essential oils taken into the study, it was observed that the values of the components present vary between 0.026% (+)- α -Carene and 85.17% Eugenol. It was found that the essential oils studied have a very different chemical composition, predominating in the case of the thyme essential oil Borneol (17.5%); in the case of the essential basil oil Estragole (55.73%); for the rosemary essential oil Eucalyptol (52.82%); in the case of the essential juniper oil, the compound Alpha pinene (49.75%); Carvacrol (33.42%) predominated in the composition of oregano essential oil; peppermint essential oil had a high Menthone content (30.73%); the essential oil of cloves had a high content of Eugenol (85.17%), and in the composition of the essential oil of cinnamon the compound Cinnamaldehyde predominated (69.28%).

The presence in different concentrations of the chemical compounds identified in the analyzed essential oils may be responsible for the different effect on some potential disease-causing pathogens of bee colonies. At the same time, some chemical compounds in essential oils can have a favorable or inhibitory influence on queen egg laying correlated with the development of bee colonies and the expression of productive potential.

Chapter 5 presents the research on the evaluation of the use of essential oils on the improvement of the bioproductive indices of bee colonies. We observed, 10 days after the administration of the sugar syrup in which essential oils were added, an increase in the number of cells with sprouts between 11.88% (thyme) and 39.86% (basil) compared to the control group. An increase in the number of cells with sprouts was also found in the case of the administration of the essential oils of mint (20.27%), oregano (21.67%), rosemary (17.24%) and juniper (24.70%). Statistically significant results were obtained in the case of the batch containing basil essential oil ($p < 0.01$).

At 21 days of administration of the supplementary feed with the addition of essential oils there was an increase in the number of cells with sprouts between 12.22% (cinnamon) and 50% (thyme and basil) ($p < 0.001$). Experimental groups fed sugar syrup incorporating thyme essential oil and basil essential oil had a 50% increase in the number of brood cells ($p < 0.001$) compared to the control group. The experimental group with the addition of essential oil of oregano had an increase in the number of sprouted cells by 40.97% ($p < 0.01$), followed by the group with the addition of essential oil of peppermint (29.86%) ($p < 0.01$) compared to the control group. Juniper essential oil caused an increase in the amount of sprouts by 27.03% ($p < 0.05$), and in the case of rosemary essential oil, an increase in the number of cells with sprouts by 18.47% ($p < 0.05$) compared to the control group. In the case of the other essential oils used, there was an increase in the number of cells with sprouts by 12.22% in the batch with the addition of essential oil of cinnamon, and in the batch with the addition of essential oil of cloves the amount of sprouts increased by 16,80% compared to the control group with statistically insignificant differences.

Feeding bee colonies in the spring with sugar syrup in which one essential oil was incorporated (thyme, juniper, rosemary, basil, oregano, cloves, mint, cinnamon) had the effect of stimulating queen laying correlated with the development of bee colonies and a greater production of honey. The development of bee colonies after feeding with sugar syrup and essential oils was also observed from the increase in the number of frames occupied by bees.

In terms of honey production, the bee colonies belonging to the batches fed with sugar syrup and essential oils experienced increases in honey production ranging from 7.53% (cinnamon oil) to 31.09% (peppermint oil).

The use of basil essential oil led to the development of bee colonies and a significant increase in honey production when harvesting rapeseed ($p < 0.001$). Strong positive correlations were recorded between the number of brood cells and honey production and in the case of thyme essential oil ($R^2 = 0.859$, $p < 0.001$), mint ($R^2 = 0.718$, $p < 0.001$) and oregano ($R^2 = 0.621$, $p < 0.001$). Weakly positive correlations between the number of brood cells and honey production were observed in the group with the addition of cinnamon essential oil ($R^2 = 0.482$, $p > 0.05$) and in the case of the use of rosemary, clove, juniper essential oil ($p > 0.05$).

The cost of additional feeding during the 3 weeks of a colony of bees from the control group was 1.29 euros. In the case of the batches that were given one essential oil in the sugar syrup, the cost of additional feeding was between 1.44 - 1.50 euros. The cost of the batches to which essential oil of thyme, oregano, juniper and cinnamon was added was 1.44 euros/bee colony. In the case of rosemary, mint, clove oils, the cost was 1.47 euros/bee colony, and the cost for the batch with added basil was 1.50 euros/bee colony.

The production obtained following the administration of the additional feeding with sugar syrup in which one of the studied essential oils was added, after the rapeseed harvest, was between 26.49 - 32.16 kg/bee colony, and the honey production of the batch control was 25.09 kg/bee colony.

Revenues from the sale of rapeseed honey were higher in the case of additional feeding of bee colonies with the addition of essential oils compared to the control group fed only sugar syrup. These were between 97.48 – 121.44 euros/bee colony compared to the control batch from which we obtained an income of 92.09 euros/bee colony.

In **Chapter 6**, the effects of the use of essential oils on the health of bee colonies are highlighted. From the smears carried out and examined, as well as from the inoculations on special culture media, it was found that the inoculated bacteria, originating from the intestine of the bees under study, belong to the genera: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, and among the microscopic fungi we identified *Candida* (first sampling) and *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* (second sampling) and *Bacillus*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* (the third sampling).

In the spring period, at the beginning of the experiment, the total number of germs in the intestine of the worker bees was close in all experimental variants. After the first and second administration of supplementary food in which essential oils were added, the reduction of the total number of germs was observed in the group fed with sugar syrup in which essential oil of thyme was incorporated (16.53%), essential oil of cloves (16.31%), oregano (12.58%) and rosemary (7.34%). 21 days after the administration of the essential oils, major differences were observed regarding the total number of germs in the intestine of the worker bees compared to the control group. At the end of the experiment, a reduction in the total number of germs at the intestinal level was observed in all experimental groups compared to the control group. The percentage values were between 14.22% (basil) and 36.36% (cinnamon). After 3 weeks of administration of essential oils, the group with the addition of rosemary had the effect of reducing the total number of germs by 21.50% compared to the control group, juniper oil reduced the total number of germs by 24.14%, being followed by essential oil of oregano with 27.82%.

The administration of essential oils of thyme, juniper, rosemary, basil, oregano, cloves, mint, cinnamon in the complementary feeding of bee colonies in the fall, determined the reduction of the total number of germs in the gut of bees by 32.54% in the case of the essential oil of oregano, 29.95% in the case of peppermint essential oil, and thyme essential oil reduced the total number of germs in the gut by 25.43%.

Reduction of total germ counts in the gut of worker bees is correlated with better bee colony health.

Chapter 7 presents research on the histological evaluation of the small intestine following the use of essential oils. From the histomorphometric analysis performed on the intestinal mucosa, it was found that the administration of essential oils in the additional food of bee colonies influenced the development of intestinal villi depending on the administered oil. Thus, the average height of the intestinal villi in the experimental groups varied between 66.32 μm (juniper) and 141.2 μm (mint), compared to the control group where the average height was 51.68 μm .

It stands out in the case of the batch to which mint essential oil was added, a 173.21% greater development of the villi of the small intestine compared to the control batch. The next experimental batch where statistically significant differences were observed ($p < 0.01$) in terms of villus development, was the one with the addition of cinnamon essential oil where an increase of 86.84% was observed. In the group with the addition of essential oil of oregano, an evolution was observed in terms of intestinal villi, with values that are 57.27% higher compared to the control group. Basil essential oil showed an evolution of the development of intestinal villi by 43.18%, thyme essential oil by 36.76%, rosemary essential oil by 35.06%, clove essential oil by 29.95%, and essential of juniper with 28.32%, the recorded values being statistically significant ($p < 0.01$) compared to the control group.

Chapter 8 addresses the organoleptic and chemical characterization of honey resulting from the use of essential oils and their biotechnological potential expressed through antioxidant and antimicrobial activity.

The results obtained at the first harvest show that the honey samples had a very close number of points between the batches, which indicates that the quality of the honey was close in terms of sensory characteristics in all experimental variants, this coming from the reserve of wintering of bee colonies.

After analyzing the honey samples collected after the rapeseed harvest, an improvement in the organoleptic properties of the honey was found, compared to the second harvest, of between 9 and 25 points. The best score was obtained by LE1 (thyme), LE7 (mint) and LE5 (oregano), this being 9 points, which denotes a better quality compared to the control batch. In the case of LE3 (rosemary) and LE4 (basil), an improvement in quality was found, according to the score (13 points) compared to the control batch. After analyzing LE2 (juniper), LE6 (clove) and LE8 (cinnamon), slightly positive effects were found in terms of honey quality (21 points) compared to the control group (25 points). After the examination of the "honey" (harvest II), positive effects in terms of organoleptic properties were revealed in all experimental groups with scores between 5 points (thyme) and 24 points (control group). Thus, LE1 (thyme), LE7 (mint), LE5 (oregano) obtained higher scores, meaning the improvement of organoleptic properties.

The analysis of the honey samples at the beginning of the experiment (polyflora honey from the winter reserve) revealed the percentage of moisture between 14.94% and 21.93%. 7 days after the administration of sugar syrup with essential oils, a decrease in the water content of the samples was observed in all experimental variants, while in the control group, the water content increased by 2.2%. Three weeks after the use of essential oils in the additional feeding of bee colonies, i.e. after the first harvest (rapeseed harvest), the experimental groups recorded increases in the water content of honey between 0.66% (thyme) and 2.94% (cinnamon).

The impurity content varied between 4.11% for the batches where oregano essential oil was used, after harvest III and 9.11% for the sample of honey with essential oil of mint, after harvest I. After analyzing the samples collected after the administration of the sugar syrup with essential oils, respectively after harvesting the rapeseed honey, a reduction in the content of impurities in the honey was observed in all the experimental groups, especially in the groups where oregano, mint and basil essential oil was used, compared to the control batch.

Analyzed values for ash content ranged from 0.23% to 0.46%. In the case of LE7 (mint essential oil) a 23.33% reduction in ash content was observed between harvest I and harvest III. Clove essential oil showed a 14.70% reduction in ash content after the third harvest compared to the first harvest. The average value of the calcined samples for the first harvest was 0.31%, for the second harvest 0.31%, and for the third harvest 0.30%, thus obtaining a reduction in the amount of ash by 3.22% between the first and last harvest. The reduction of the ash content of the samples with the addition of mint essential oil can be correlated with the results obtained following the determination of moisture which show that in the batch fed with sugar syrup and the addition of mint essential oil, the harvested honey had a higher percentage of moisture relative to the percentage of dry matter. The mineral content of honey can be influenced by the composition of essential oils due to the active compounds present.

The evaluation of the acidity of the honey samples obtained at harvest I and harvest II did not reveal significant changes compared to the control batch. At harvest III, the samples from the batches fed with the addition of essential oils recorded changes in the acidity profile compared to the control batch. The batch where oregano essential oil was used had 26.82% less honey acidity, and when thyme essential oil was used a 25% reduction in acidity was observed. Juniper essential oil reduced acidity by 28.12%, followed by the batch with added mint essential oil (29.41%) and clove essential oil (35.48%). The control batch did not show significant changes in honey acidity during the 3 harvests. Statistically significant differences were recorded between all batches fed with sugar syrup and essential oil from harvest III and the control, and also between the thyme samples (harvest I and II) and the control. The reduction of the acidity of the samples of harvest III (after rapeseed harvest) can provide us with information on the fact that the honey from the the flower nectar has a higher percentage of acidity compared to the honey resulting from the additional feeding with sugar syrup and essential oils, due to the content of acids in flower nectar to which products resulting from its enzymatic processing by bees are added.

The pH analysis of the honey samples was performed at temperatures between 23.6°C and 25.8°C, the recorded values being between 3.42 and 4.03. Both the data recorded in the samples collected before the administration of the sugar syrup with the addition of essential oils and the samples collected after the use of the essential oils, i.e. after harvesting the rapeseed, had close pH values. Statistical differences were highlighted in the samples obtained from bee colonies fed with the addition of essential oil of mint (harvest II), juniper, clove, cinnamon, oregano (harvest III).

The values of the reducing sugar content were reduced in all the experimental batches where essential oils were used, compared to the honey from harvest I (before the administration of essential oils). Reducing sugar reduction values for batches with added essential oil ranged from 8.67% (mint essential oil) to 16.84% (oregano essential oil). Statistical differences were observed in the case of the samples with the addition of thyme essential oil compared to the control batch and in the case of cinnamon essential oil compared to the control batch, at all harvest periods. Significant differences were also recorded in the case of the essential oil of basil, mint, oregano (harvest III) compared to the control batch, followed by the batches with the addition of essential oil of oregano, cloves, juniper (harvest II) and rosemary (harvest I), compared to the control batch.

At the beginning of the experiment, analyzing samples of polyflora honey, which remained as a reserve during the winter in the hive, we observed that the total phenolic content in the control sample was 122.02 (mgGAE)/100 g. The total content of phenolic compounds at harvest I was between 110.12–159.74 (mgGAE)/100 g, the lowest value was recorded in the batches to which cinnamon essential oil was introduced, and the highest value was recorded in batches with added basil essential oil. After 3 weeks of administration of sugar syrup with essential oils, the collected honey samples had a polyphenol content between 123.51–162.94 (mgGAE)/100 g. The control sample recorded the lowest value, respectively the sample of honey with basil essential oil the highest value of total phenolic content, followed by mint and thyme. Rapeseed honey samples had a total phenolic content between 123.91 (control)—163.95 (mgGAE)/100 g. The highest total phenolic content value was recorded after analyzing the sample with added essential oil of basil, followed by the sample with rosemary, oregano, juniper, mint, thyme and cinnamon. The maximum values were recorded in harvest II, except for the batches where essential oil of rosemary and essential oil of oregano were introduced where, in harvest III, the maximum total phenolic content was obtained. With the exception of honey harvested after the last thyme oil administration, for all other samples there are statistically significant differences in total phenolic content compared with the control.

The results of the samples taken in the study highlight an increase in the content of phenols conferred by the addition of essential oils to the food of bee colonies. The total phenolic content of honey collected from bee colonies fed with mint essential oil was 143.7 mgGAE/100g, and in the case of samples collected from batches with added thyme essential oil, it was 137.88 mgGAE/100g. In the case of the administration of basil essential oil in the additional food of the bee colonies, an increase in the total phenol content was found compared to the control group, even after 7 days of administration, and these values remain constant even after a month of administration of essential oils. Following these results it can be said that the essential oils used in the additional food of bee colonies can improve the antioxidant activity of honey.

The content of flavonoids varies between 8.41 mgQE/100 g in the control and 44.36 mg/100 g in the batch where mint essential oil was used. The content of flavonoids increased after the administration of sugar syrup with essential oils in all samples taken in the study after 7 days; the highest value was recorded in the batch with the addition of essential oil of mint and juniper. In the batches where essential oil of mint, oregano, rosemary and juniper were used, the flavonoid content was reduced at harvest III compared to harvest I, the values being between 8.41–19.51 mgQE/100 g. The samples containing thyme, basil, clove and cinnamon essential oil showed an increase in the flavonoid content at harvest III compared to the first harvest, the values being between 27.05–30.60 mg QE/100 g. In the case of the second harvest, the samples with the addition of essential oil of thyme, juniper and mint had positive but statistically insignificant effects compared to the control sample (without the addition of essential oil).

Our results show an increase in the content of flavonoids after 7 days of the administration of the supplementary feed in which essential oils were incorporated in all experimental variants, which demonstrates the effectiveness of the feed supplementation (sugar syrup enriched with essential oils). After harvesting II and III, there are variations in the flavonoid content, either increasing or decreasing depending on the type of essential oil administered. It should be noted that in the control group, the amount of flavonoids increases from the first to the last harvest, which means that their intake is ensured not only by the syrup with the addition of essential oils introduced in the bee feeding.

The antioxidant activity (AA) of the honey samples taken in the study was highlighted in all batches to which we administered sugar syrup with the addition of essential oil. Honey samples with the addition of essential oil of juniper, clove, rosemary, basil, thyme, cinnamon, oregano recorded significant values. The average value of the antioxidant activity of the analyzed honey was 22.88% (harvest I), 30.15% (harvest II) and 50.37% after harvest III

(for rapeseed honey). In the control sample, the antioxidant activity value ranges between 24.37% (harvest I) and 34.58% (harvest III), while in the experimental samples, after the use of essential oils, its values increase up to 61.64%, the value maximum recorded for the batch to which juniper oil was introduced. Close post-harvest III values were obtained when basil, clove or rosemary essential oils were used in bee feeding. Samples from harvest II and harvest III determined statistically significant increases in antioxidant activity compared to the control group. The highest value of antioxidant activity was recorded in our experiment, after the administration of juniper essential oil (61.64%), followed by clove essential oil (57.93%), basil essential oil (56.33%) compared to the value recorded in the control samples (34.58%), after harvest III. The increase in antioxidant activity at the end of the experiment is visible for all experimental variants, including the control, but to a lesser extent compared to the antioxidant activity recorded in the samples enriched with essential oils.

The antimicrobial activity of the analyzed samples is obvious in the case of those with the addition of essential oil, developing an inhibitory effect over time. The inhibitory properties are much more evident in the case of harvest III.

In the case of the bacterium *S. pyogenes*, the antimicrobial activity is very weak in the samples taken in harvest II. In contrast, increasing the concentration of the samples taken in harvest II resulted in an obvious potentiation effect, with values much higher than those of the control batch. There is only one test with an evident inhibitory effect sustained with increasing concentration, namely in the case of samples that contained rosemary essential oil (concentration 37.5% and 50%, respectively). The values of the minimum inhibitory concentration obtained vary between 0.747–0.719, with lower values than those obtained in the case of the bacterium *S. pyogenes* (0.796). The only samples with an inhibitory effect that increase with increasing concentration are the samples from the control batch (with values between 0.734 and 0.748) and the samples with the addition of essential oil of oregano (concentration 12.5%) (0.787), essential oil of cloves (12.5% concentration) (0.78) and mint essential oil (12.5% concentration) (0.704). All other values are greater than the control value, thus cannot be considered minimum inhibitory concentration and have an obvious potentiating effect. The situation is slightly different in the case of harvest III, when, in addition to maintaining the inhibitory effect of the samples with the addition of rosemary essential oil, the same effect also appears in the case of mint essential oil with a concentration of 25% (0.729), 37.5% (0.716) and 50% (0.705) as in samples enriched with basil essential oil.

In the case of *S. aureus* (ATCC 25923), the evolution of inhibition between harvest II and harvest III is obvious. Thus, if in the case of harvest II only the essential oil of rosemary, oregano and juniper obviously had antistaphylococcal activity, supported by the increase in concentration, in the case of harvest III, the number of samples with an inhibitory effect is greater, namely the essential oil of basil, thyme, rosemary, oregano and juniper. Even the values obtained in the case of samples with effect in both sampling periods had improved antimicrobial effect in collection III. This is evident in the case of samples with the addition of rosemary, for which, in the case of harvesting II, the inhibition values are present only at two of the tested concentrations rosemary 37.5% and rosemary 50% (0.67; 0.534), while in the case of harvest III, all tested concentrations had an inhibitory effect with values between 0.564 and 0.621 compared to the control group, which had an optical density of 0.629 *S. aureus*.

Bacterial cultures of *S. flexneri*, *S. typhimurium* and *E. coli* were found to be some of the most susceptible strains to the activity of samples taken during harvest I. So, regarding the bacterial culture *S. flexneri*, the most effective samples with minimum inhibitory concentration values proved to be the control group (0.923–0.878), the group with the addition of basil essential oil (0.922–0.882), rosemary (0.849–0.705), clove (0.789–0.646) and cinnamon (0.753–0.714), compared to the positive control (BHI) which showed an optical density of 0.956.

Regarding the antibacterial effect of *P. aeruginosa*, we observed that it was the least sensitive strain. Among all the samples tested during harvest II, antibacterial activity with proven effect was present only in the samples with the addition of 37.5% rosemary and 50% rosemary and all four tested concentrations of the samples with the addition of mint essential oil (harvest III) (0.927–0.998).

In our research, *E. coli* proved to be the most sensitive strain, being the most susceptible to most of the samples tested in harvest II and also in harvest III. Only the samples enriched with rosemary, juniper and clove essential oil showed minimum inhibitory concentration values, but with a potentiating effect, while all other tested samples showed minimum inhibitory concentration values with an obvious inhibitory effect, correlated with the concentration.

In the case of the bacterial culture *S. typhimurium*, in harvest II, the antibacterial effect was present only in a few samples, the same effect being recognized in harvest III, as follows: the essential oil of basil, thyme, oregano and mint for harvest II and the control group, basil, rosemary and oregano in case of harvest III. The effect was better at harvest III, and these data were supported by values that proved an inhibitory effect in all concentrations tested. The difference was present only in the case of the sample with added mint essential oil, where the inhibitory effect from harvest II decreased in harvest III.

In our research, *H. influenzae type B* (ATCC 100211) was more resistant to the antibacterial effect of the tested samples in harvest II, being only susceptible to clove essential oil (0.764–0.538), the control group 37.5% and 50 % (1.233–1.103) and mint essential oil, for all four concentrations tested (1.127–1.273). In the samples tested during harvest III, the minimum inhibitory concentration values proved by the control, thyme, rosemary, oregano, cloves, cinnamon and mint had inhibitory effect, proved in all tested concentrations.

Regarding the antifungal effect *C. parapsilosis* proved to be more susceptible, while *C. albicans* showed a lower sensitivity in all tested samples. In the case of the bacterium *C. parapsilosis*, for harvest II, essential oil of thyme, oregano, cloves and mint 50% demonstrated minimum inhibitory concentration values correlated with increasing concentration. The control batch, essential oil of thyme, rosemary, oregano, clove and mint maintained the same efficacy in harvest III with lower optical density values compared to those obtained for harvest II, as shown. *C. albicans*, on the other hand, proved to be resistant, showing minimum inhibitory concentration values that decrease with increasing concentration for all samples tested, both in harvest II and harvest III.

Through these values we can conclude that the essential oils present in the additional feeding of the bees produced honey with an antibacterial effect that increased after two weeks of administration.

